

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/053126 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015835

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-359956
2002 年 12 月 11 日 (11.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 友野 潤 (TOMONO, Jun) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川 2 丁目 12-1 ハーモパレス草津 313 号 Shiga (JP). 上野 はるみ (UENO, Harumi) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川 2 丁目 12-1 ハーモパレス草津 609 号 Shiga (JP). 岸本 真幸 (KISHI-MOTO, Masayuki) [JP/JP]; 〒520-2133 滋賀県 大津市 野郷原 1 丁目 14-3 タカラバイオ瀬田寮 208 号 Shiga (JP). 佐川 裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋川 2 丁目 6-32

Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒529-1851 滋賀県 甲賀郡 信楽町長野 1454-15 Shiga (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COLD-INDUCED EXPRESSION VECTOR

(54) 発明の名称: 低温誘導発現ベクター

(57) Abstract: A vector having a region encoding a cold shock protein gene mRNA-origin 5' -nontranslated region, characterized in that the 5' -nontranslated region has a mutation having been transferred therein so as to change the distance of the stem structure formed by the region.

(57) 要約: コールドショック蛋白質遺伝子 mRNA 由来の 5' 非翻訳領域をコードする領域を有するベクターであって、前記 5' 非翻訳領域が、該領域が形成するステム構造の距離が変化するように変異を導入されたものであることを特徴とするベクター。

WO 2004/053126 A1

明 細 書

低温誘導発現ベクター

5 技術分野

本発明は、遺伝子組換え技法において使用されるベクター、及び該ベクターを用いた蛋白質の発現方法に関する。

背景技術

10 遺伝子組換え技術を用いた有用蛋白質の生産は、今日では広く用いられている技術である。中でも大腸菌を宿主とした発現系は最も一般的に用いられている発現系であり、多くの蛋白質が組換え体によって生産されるようになってきた。これら組換え体による有用蛋白質の生産には、RNAポリメラーゼに認識されるプロモーター支配下に目的遺伝子を配置した、いわゆる発現ベクターを構築して用いるのが一般的である。発現ベクターに用いられるプロモーターの例としては、例え
15 ば大腸菌を宿主とする場合には、lac、trp、tac、gal、ara等のプロモーター等が使用されている。また、これら大腸菌のRNAポリメラーゼに直接認識されるプロモーター以外のものを利用した発現ベクターとして、大腸菌に感染するバクテリオファージT7のRNAポリメラーゼに認識されるプロモーターを利用したpET-システム（ノバジェン（Novagen）社製）（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー（J. Mol. Biol.）、
20 第189巻、第113～130頁（1986）、ジーン（Gene）、第56巻、第125～135頁（1987）参照）がある。pET-システムの場合、T7 RNAポリメラーゼを大腸菌内で発現させ、このT7 RNAポリメラーゼにより
25 発現ベクター上のT7プロモーター下流に配置された目的遺伝子の転写が行われ、更に宿主の翻訳システムによって目的蛋白質の合成が行われる。

しかしながら、pET-システムも含めた多くの大腸菌発現系で目的蛋白質が高レベルで発現された場合、目的蛋白質が不溶性の複合体、いわゆるインクルージョンボディとなり、活性型の目的蛋白質の量が非常に低くなる場合が多い。い

くつかのポリペプチドでは、インクルージョンボディを可溶化後リフォールディング操作を行って活性型ポリペプチドを得た例が報告されているが、一般的にその回収量は低い場合が多く、また、各目的蛋白質ごとに適切なリフォールディング条件を検討する必要がある。そのため、活性型蛋白質を直接大腸菌内で発現させるシステムが求められていた。

インクルージョンボディの形成は、翻訳されたポリペプチド鎖が正しい立体構造にフォールディングする前の中間体の段階で、分子間相互作用により他のポリペプチド鎖と絡み合い、巨大な不溶性の複合体となることによると考えられている。このような場合、組換え体大腸菌の培養温度を通常用いられる37℃よりも低い温度(20~30℃)で行うと活性型蛋白質の発現量が増加することが知られている。これは、リボソームによる翻訳の速度が遅くなることにより、中間体が正しい構造にフォールディングする時間的ゆとりが得られることと、低温条件下で細胞内蛋白質分解酵素の働きが遅くなり、発現された活性型蛋白質の安定性が増すためと推測されている。このように、インクルージョンボディとなる蛋白質の生産には、低温条件下で組換え体大腸菌を培養する方法は有効な方法として注目されてきた。

一方、対数増殖期の大腸菌の培養温度を37℃から10~20℃に低下させると大腸菌の増殖は一時的に止まり、その間にコールドショック蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質の発現が誘導される。該蛋白質はその誘導レベルに応じて第I群

(10倍以上) 第II群(10倍未満)に分けられ、第I群の蛋白質としては、CspA、CspB、CspG、及びCsdAなどが挙げられる(ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bacteriol.)、第178巻、第4919~4925頁(1996)、ジャーナル オブ バクテリオロジー(J. Bacteriol.)、第178巻、第2994~2997頁(1996)参照)。

中でもCspA(国際公開第90/09447号パンフレット参照)は、37℃から10℃への温度シフトの1.5時間後にその発現量は全菌体蛋白質の13%までに達することから(プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ USA(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第87巻、第283~287頁(1990)参

照)、低温における組換え蛋白質の生産に *c s p A* 遺伝子のプロモーターを利用することが試みられてきた。

c s p A 遺伝子を用いた低温条件下での組換え蛋白質発現系は、上述のように該遺伝子のプロモーターが低温で高効率で転写を開始させること以外に、以下の

5 ような有効性が示されている。

(1) *c s p A* 遺伝子から転写された翻訳可能な mRNA が機能を有する *C s p A* 蛋白質をコードしていない場合、より具体的には、*C s p A* 蛋白質の N 末端配列の一部のみをコードしている場合には、このような mRNA はコールドショック蛋白質も含めた他の大腸菌蛋白質の発現を長時間阻害し、その間は該 mRNA

10 の翻訳が優先的に行われる (ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. B a c t e r i o l.)、第 178 巻、第 4919~4925 頁 (1996)、国際公開第 98/27220 号パンフレット参照)。この現象は L A C E (low temperature-dependent antibiotic effect of truncated *cspA* expression) 効果と呼ばれている。

(2) *c s p A* 遺伝子の開始コドンから 12 塩基下流の位置には、15 塩基からなるダウンストリームボックス (downstream box) と呼ばれる配列があり、低温条件下での翻訳効率を高いものにしている。

(3) *c s p A* 遺伝子 mRNA の転写開始点から開始コドンまでにある 159 塩基からなる 5' 非翻訳領域は、*C s p A* の発現に対して、37℃では負の、低温

20 条件下では正の影響を与えている。

特に上記 (1) の現象は、*c s p A* 遺伝子を利用して目的の蛋白質のみを特異的に発現させる可能性を示唆するものであり、高純度の組換え蛋白質生産、構造解析のための同位体標識された蛋白質の調製への応用が期待されている。

一方、該遺伝子のプロモーターの発現調節が不完全であり、その産物が宿主にとって有害であるような遺伝子の場合、発現ベクターを含有する大腸菌を誘導可能な状態まで培養するのが困難であったり、あるいは発現ベクターの構築すら不可能なこともあることが知られている (例えば、米国特許第 5654169 号公報参照)。

このような問題を解決するとともに、遺伝子発現の効率をより向上させ、発現

産物の取得を容易にする観点から、c s p A遺伝子の5' 非翻訳領域を使用した発現ベクターの改変が試みられている（国際公開第99/27117号パンフレット参照）。ここには、オペレーターを導入することにより発現制御を厳密にすること、5' 非翻訳領域に変異を導入して遺伝子発現量を向上させること等の改変が開示されている。

発明の開示

上記のように低温条件下での蛋白質発現系は非常に有効なシステムと考えられており、さらに発現効率等について改善されることが望まれている。

本発明の目的は、c s p 遺伝子を利用した発現ベクターについて、例えばその遺伝子発現効率を向上させ、より優れた低温条件下での遺伝子発現系を構築することにある。

本発明者らは、かかる目的を達成するためにc s p 遺伝子由来の5' 非翻訳領域についてその塩基配列の改変を導入し、その効果の評価を行った。その結果、5' 非翻訳領域部分のmRNAが形成するステム間の距離を調節することにより、その下流にコードされる蛋白質の発現量が上昇することを見出した。そして、この改変5' 非翻訳領域をコードするDNAを含有するベクターを構築し、本発明を完成するに至った。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はベクターに関し、コールドショック蛋白質遺伝子mRNA由来の5' 非翻訳領域をコードする領域を有するベクターであって、前記5' 非翻訳領域が、該領域が形成するステム構造の距離が変化するように変異を導入されたものであることを特徴とする。

第1の発明において、5' 非翻訳領域に導入される変異としては塩基の挿入若しくは欠失が例示される。特に好適な態様としては、配列表の配列番号1に示される大腸菌c s p A遺伝子中の塩基番号593～598に相当する領域に変異が導入されているベクターが挙げられる。

第1の発明のベクターは、5' 非翻訳領域をコードする領域がさらにオペレーターを有していてもよい。このようなベクターの5' 非翻訳領域の特に好適な例として配列表の配列番号2、3、4に示される塩基配列の5' 非翻訳領域が挙げ

られる。

また、第1の発明のベクターは5' 非翻訳領域をコードする領域の上流にプロモーターを有していてもよい。さらに、5' 非翻訳領域をコードする領域の下流に、用いる宿主のリボソームRNAのアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する塩基配列を有していてもよい。

第1の発明のベクターは、例えばプラスミドベクターであってもよい。

本発明の第2の発明は目的蛋白質の発現方法に関し、下記工程を包含することを特徴とする。

(1) 目的蛋白質をコードする遺伝子を組込んだ第1の発明のベクターで宿主を形質転換する工程、

(2) 得られた形質転換体を培養する工程、

(3) 培養温度を通常の温度より低下させて目的蛋白質を発現させる工程。

また、第2の発明においては、工程(3)と同時にもしくはその後にプロモーターを誘導してもよい。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を具体的に説明する。

本明細書において「領域」とは核酸(DNA又はRNA)上のある範囲を指す。また、本明細書に記載の「mRNAの5' 非翻訳領域」とは、DNAからの転写によって合成されるmRNAのうち、その5' 側に存在し、かつ蛋白質をコードしていない領域をいう。以降の本明細書においては該領域を「5' -UTR (5' -Untranslated Region)」と記載することがある。なお、特に断らない限り5' -UTRは大腸菌cspA遺伝子のmRNA、あるいはこれが改変されたものの5' 非翻訳領域をさす。

本明細書において「コールドショック蛋白質遺伝子」とは、生物の生育温度を生理的な温度から低下させた際にその発現が誘導される蛋白質をコードする遺伝子を指す。

本発明に使用される、コールドショック蛋白質mRNAの5' -UTRをコードする領域とは、当該遺伝子のmRNAの開始コドンよりも5' 側の部分をコー

ドしている領域である。大腸菌のコールドショック蛋白質遺伝子 (c s p A、c s p B、c s p G、c s d A等) にはこの領域が特徴的に見出されており [J. Bactriol.、第178巻、第4919～4925頁(1996)、J. Bactriol.、第178巻、第2994～2997頁(1996)]、これらの遺伝子から転写されたmRNAのうちの5'末端より100塩基以上の部分が蛋白質に翻訳されない。この領域は遺伝子発現の低温応答性に重要であり、任意の蛋白質のmRNAの5'末端にこの5'非翻訳領域を付加することにより、該mRNAから蛋白質への翻訳が低温条件下で起こるようになる。

なお、本発明に使用される「mRNAの5'非翻訳領域」は上記の特定の遺伝子由来のものに限定されるものではなく、コールドショック蛋白質遺伝子に由来し、かつ2以上のステム構造を形成しうる5'非翻訳領域を本発明に使用することができる。

本発明のベクターには上記に列記されたコールドショック蛋白質遺伝子由来の5'-UTRをコードする領域を使用することができるが、特に大腸菌 c s p A 遺伝子由来のものが好適に使用できる。大腸菌 c s p A 遺伝子の塩基配列は G e n B a n k 遺伝子データベースに受託番号M30139として登録、公開されている。この塩基配列を配列表の配列番号1に示す。さらに、本発明にはその塩基配列を一部改変した5'-UTRを使用することもでき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載されたプラスミドpMM047、pMM048等に保持されたc s p A遺伝子由来5'-UTRをコードする領域を使用することができる。上記プラスミドpMM048に保持された大腸菌c s p A遺伝子由来の5'-UTRをコードする領域の塩基配列を配列番号5に示す。当該配列は、本願実施例において使用されているプラスミドpC o l d 0 8 N C 2の保持している5'-UTRをコードする領域の塩基配列と同一である。

本発明は、5'-UTRが形成すると予想される二次構造において、ステム間の距離を調整するような変異を5'-UTRをコードする領域に導入することを特徴とする。例えば、ステム間に相当する部分に塩基を挿入する、若しくはこの部分の塩基の一部を欠失させることによりステム間の距離を広げる、あるいは狭めることができる。このような変異は、当該変異によって変異を導入していない

ものに比べてその下流に接続された遺伝子の発現量が上昇する限りにおいて、その導入位置、挿入、あるいは欠失される塩基の数には限定はない。また、当該変異としては、5' -UTRの有している低温特異的な遺伝子発現を達成する能力を妨げないものが好ましいことは言うまでもない。

- 5 大腸菌 *cspA* 遺伝子由来の 5' -UTR は、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列において、塩基番号 584～593、598～608 の領域でそれぞれステム構造を形成することが予想される。したがって、この間の領域（塩基番号 593～598）、若しくは変異を導入された 5' -UTR における前記領域に相当する領域に塩基の挿入、若しくは欠失を導入することにより、ステム間の距離を調節することができる。なお、本発明は上記のステム間の距離の調節に限定
- 10 されるものではない。

前記の欠失変異としては、ステム間の領域の 1 塩基～全塩基の欠失が本発明に包含される。また、挿入変異としては、1～100 塩基、好ましくは 3～60 塩基、より好ましくは 8～40 塩基の挿入が例示される。

- 15 特に本発明を限定するものではないが、下記実施例に記載されたプラスミドベクター pCold08s2、pCold08s12、pCold08s32 に含まれる 5' -UTR は本発明の好適な態様として例示される。前記プラスミドベクターに含まれる 5' -UTR の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 2、3、4 に示す。

- 20 上記の、本発明により作製される、ステム間の距離が調節された 5' -UTR をコードする領域を使用し、本発明の発現ベクターを作製することができる。すなわち、出発材料となる、5' -UTR をコードする DNA について、そこにコードされる mRNA が形成する二次構造を推定し、ステム間に相当すると予想された位置に公知の手法により挿入または欠失変異を導入し、こうして得られた DNA を適切なプロモーターとともにベクターに組み込み、作製すればよい。
- 25

本発明のベクターは、ベクターとしての目的を達成できるものであれば一般的に用いられるベクター、例えばプラスミド、ファージ、ウイルス等のいずれであってもよい。さらに、本発明のベクターは宿主に導入された後にはそのゲノム DNA 上に組み込まれてもかまわない。

前記の 5' -UTR は、本発明のベクターにおいてはプロモーターと目的蛋白質をコードする領域との間に挿入される。本発明に使用されるプロモーターとしては、低温で高いプロモーター活性を有することが期待されるコールドショック蛋白質遺伝子由来のプロモーター、例えば *cspA*、*cspB*、*cspG*、*csdA* といった遺伝子由来のプロモーターが例示されるがこれらに限定されるものではなく、使用する宿主中で RNA への転写を開始する活性を有するものであればよい。大腸菌が宿主として用いられる場合には、*lac*、*trp*、*tac*、*gal*、*ara* 等のプロモーターを使用することができる。

また、本発明のベクターに含有される上記の構成要素以外の領域としては、例えば複製起点、選択マーカーとして使用される薬剤耐性遺伝子、オペレーター、ターミネーター等の調節配列を有することができる。

前記オペレーターとしては種々の遺伝子の発現調節領域に存在するオペレーター、例えば、大腸菌ラクトースオペロン由来の *lac* オペレーターを本発明に使用することができる。*lac* オペレーターは適当な誘導物質、例えばラクトースやその構造類似体、特に好適にはイソプロピルー β -D-チオガラクトシド (IPTG) の使用によってその機能を解除し、プロモーターを作用させることが可能である。このようなオペレーター配列は、通常、プロモーター下流の転写開始点付近に配置される。

本発明のベクターはさらに、オペレーターの機能に必要な調節遺伝子、例えば *lac* オペレーターに対しては *lacI^q* 遺伝子等を有していてもよい。

また、上記構成要素に加えて、用いる宿主のリボソーマル RNA のアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する塩基配列を 5' 非翻訳領域の下流に含有させることにより発現効率を上昇させることができる。例えば大腸菌の場合、16S リボソーマル RNA の 1467-1481 の位置にアンチダウンストリームボックス配列が存在し (The EMBO Journal、第 15 巻、第 665~674 頁 (1996))、この配列と高い相補性を示す塩基配列を含有するコールドショック蛋白質の N 末端ペプチドをコードする領域を用いることができる。アンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する配列は、開始コドンから数えて 1~15 塩基目程度のところから始まるように配置されると効果的

である。目的蛋白質をコードする遺伝子は、該蛋白質がこれらのN末端ペプチドとの融合蛋白質として発現されるようにベクターに組込まれるか、あるいは、目的蛋白質をコードする遺伝子がアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有するように、部位特異的変異導入法により塩基置換が導入されることができる。

5 目的蛋白質が融合蛋白質として発現されるようにベクターに組込まれている場合、該ペプチドは目的蛋白質が活性を失わない範囲で任意の長さのものであってよい。このような融合蛋白質発現用ベクターは、例えば適当なプロテアーゼによって該融合蛋白質から目的蛋白質を単離できるよう、その接続部分に工夫が施されたもの、精製あるいは検出に利用可能なペプチドと融合蛋白質として発現されるよう
10 に工夫が施されたもの等であることができる。発現蛋白の精製に利用可能なポリペプチドとしては、特に限定するものではないが、例えばヒスチジンータグ（H i s - T a g）やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（G S T）等が例示される。

例えば、プラスミドとして構築された本発明のベクターを使用した目的蛋白質
15 の発現は以下のような工程で実施される。本発明のプラスミドベクターに目的の蛋白質をコードする遺伝子をクローニングし、該プラスミドで適当な宿主を形質転換することにより、該蛋白質を発現させるための形質転換体を得ることができる。このような形質転換体は培養温度を低下させることにより、目的蛋白質を特異的に発現する。この際、オペレーターを保持するベクターの場合には、適切な
20 手段で当該オペレータの機能を解除し、プロモーターを誘導してもよい。

本発明のベクターを使用した蛋白質の発現においては、前記のL A C E効果のために目的の蛋白質の翻訳が優先的に行われるため、従来の組換え蛋白質の発現に比較して培養物あたりの目的蛋白質の含量が高い。したがって高純度の目的蛋白質を調製することが可能である。さらに、適切な同位体の存在下に目的蛋白質
25 の発現を実施して同位体標識された蛋白質を調製することができる。こうして得られた高純度の標識蛋白質はNMRによる構造解析に適しており、例えば培養物、もしくはその溶解物を直接NMR解析に供することも可能である。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施

例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル第2版 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.) に記載の方法によった。更に、以下に示すプラスミドの構築には、特に記載のない限り大腸菌 JM109 を宿主とし、50 μ g / ml のアンピシリンを含む LB 培地 (トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、NaCl 0.5%、pH 7.0) あるいは前記培地に 1.5% の寒天を加え固化させた LB 寒天培地を用いた。

参考例 プラスミド pCold08NC2 の構築

国際公開第 99/27117 号パンフレットの記載に基づき、Escherichia coli JM109/pMM047 (FERM BP-6523) (平成9年(1997年)10月31日(原寄託日)に日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託)に保持されたプラスミド pMM047 を出発材料として pCold08NC2 を構築した。プラスミド pCold08NC2 は、上流側より順番に lac プロモーター、改変された大腸菌 cspA 遺伝子由来 5' -UTR、マルチクローニングサイトを有するプラスミドである。また、当該プラスミドは、lacI 遺伝子、大腸菌 16S リボソーム RNA 中に存在するアンチダウンストリーム配列に完全に相補的なダウンストリームボックス配列、6 個のヒスチジン残基からなるヒスチジントグおよびファクター Xa の認識するアミノ酸配列をコードする塩基配列、をそれぞれ有している。

実施例 1 pCold08s2 ベクターの構築及び蛋白質発現量の検討

(1) プラスミドベクター pCold08s2 の構築

下記の操作に従い、参考例 1 記載のプラスミド pCold08NC2 の 5' -UTR をコードする領域に 20 塩基の挿入変異を導入した。

プラスミド pCold08NC2 を鋳型として、合成プライマー Sp20F 及びプライマー CSPTerR (プライマー Sp20F 及び CSPTerR の塩基配

列をそれぞれ配列表の配列番号6、7に示す)を用いてPCRを行なった。50 ngのpCold08NC2、5 μ lのEx Taq緩衝液、8 μ lのdNTP混合液、5 pmolのプライマーSp20、5 pmolのプライマーCSPterR、0.5 μ lのTakara Ex Taq (タカラバイオ社製)を加え、
5 滅菌水を加えて全量を50 μ lとした。この反応液について94℃、1分間(変性)、55℃、1分間(プライマーのアニーリング)、72℃、1分間(合成反応)を1サイクルとする30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液全量を3% (w/v) 低融点アガロース電気泳動を行なった後、約300 bpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを5 μ lの滅菌水に懸濁して増幅断片SC
10 とした。

合成プライマーSp20R及びプライマーNheF2 (プライマーSp20R及びNheF2の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号8、9に示す)を用いてpCold08を鋳型としたPCRを同様の条件で行なった。このPCR反応液全量を3% (w/v) 低融点アガロース電気泳動を行なった後、約150 bpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを5 μ lの滅菌水に懸濁して、増幅断片SNとした。
15

このようにして得られた増幅断片SCとSNのそれぞれ1 μ lに5 μ lのEx Taq緩衝液、5 μ lのdNTP混合液を加え、滅菌水を加えて全量を50 μ lとした。その後94℃、10分間加熱し、60分間かけて37℃まで冷却し、さらに37℃で15分間保温した。ここに0.5 μ lのTakara Ex Taqを加えて、72℃で3分間加熱した。
20

こうして得られた反応液にそれぞれ5 pmolのプライマーNheF2、プライマーCSPterR、5 μ lのEx Taq緩衝液、5 μ lのdNTP混合液を加え、滅菌水を加えて全量を100 μ lとした。この反応液について94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、2分間を1サイクルとする30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液全量を3% (w/v) 低融点アガロースで電気泳動した後、約400 bpの増幅DNA断片をゲルより精製し、これを5 μ lの滅菌水に懸濁し、増幅断片Sp20-1とした。
25

Sp20-1を制限酵素NheI、EcoRI (ともにタカラバイオ社製)で

2重消化し、生成したDNA断片を1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。この精製DNA断片とNhe I及びEcoRIで消化したpCold08を混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシーケンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これをpCold08s2と命名した。このpCold08s2は、pCold08NC2の5'-UTR（配列表の配列番号5、lacオペレーター中の転写開始点を+1とした）の+120~+121の間に5'-GAGCGGATAACAATTTTCAACA-3'の塩基配列（配列番号11）が挿入されている（なお、この位置は配列表の配列番号1に示したcspA遺伝子の塩基配列の塩基番号597~598間に相当する）。pCold08s2に含有されている5'-UTRの塩基配列を配列番号2に示す。

(2) 蛋白質発現用プラスミドの構築

(2)-1 プラスミドベクターpCold08s2-GFPの構築

オワンクラゲ由来のGFP蛋白質をコードする遺伝子を下記の操作にしたがってpCold08s2に組み込んだ。プラスミドpQBI63（タカラバイオ社製）を鋳型として、合成プライマーGFP-F及びプライマーGFP-R（プライマーGFP-F及びGFP-Rの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号11、12に示す）を用いてPCRを行なった。50ngのpQBI63、5μlのEx Taq緩衝液、8μlのdNTP混合液、それぞれ5pmolのプライマーGFP-F、プライマーGFP-R、0.5μlのTakara Ex Taq（タカラバイオ社製）を加え、滅菌水を加えて全量を50μlとした。この反応液について94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、1分間を1サイクルとする30サイクルのPCRを実施した。このPCR反応液後の反応液全量を3%（w/v）低融点アガロース電気泳動を行なった後、約700bpのGFP遺伝子を含む増幅DNA断片をゲルより精製し、これを5μlの滅菌水に懸濁した。このDNA断片をEcoRIとXbaI（タカラバイオ社製）で2重消化し、1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。精製したDNA断片と

E c o R I 及び X b a I で消化した p C o l d 0 8 s 2 を混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含む L B 寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシーケンスを行ない、正しく P C R 産物が挿入されたプラスミドを選択し、これを p C o l d 0 8 s 2 - G F P と命名した。また、同様にして 5' U T R への挿入配列のない p C o l d 0 8 N C 2 に G F P 遺伝子を含む増幅 D N A 断片を組み込み p C o l d 0 8 - G F P とした。

(2) - 2 プラスミドベクター p C o l d 0 8 s 2 - H 2 9 6 の構築

フィブロネクチン由来のヘパリン結合ポリペプチドである H 2 9 6 フラグメント蛋白質をコードする遺伝子を、下記の操作により p C o l d 0 8 s 2 に組み込んだ。

米国特許第 5 1 9 8 4 2 3 号に記載のプラスミド p C H 1 0 2 を鋳型として、合成プライマー H 2 9 6 - F 及びプライマー H 2 9 6 - R （プライマー H 2 9 6 - F 及び H 2 9 6 - R の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 1 3、1 4 に示す）を用いて P C R を行なった。5 0 n g の p C H 1 0 2、5 μ l の E x T a q 緩衝液、8 μ l の d N T P 混合液、それぞれ 5 p m o l のプライマー H 2 9 6 - F、プライマー H 2 9 6 - R、0. 5 μ l の T a k a r a E x T a q を加え、滅菌水を加えて全量を 5 0 μ l とした。この反応液について 9 4 $^{\circ}$ C、1 分間、5 5 $^{\circ}$ C、1 分間、7 2 $^{\circ}$ C、1 分間を 1 サイクルとする 3 0 サイクルの P C R を実施した。この P C R 反応液全量を 3 % (w / v) 低融点アガロース電気泳動を行なった後、約 1 k b p の増幅 D N A 断片をゲルより精製し、これを 5 μ l の滅菌水に懸濁した。この D N A 断片を E c o R I と B a m H I （タカラバイオ社製）で 2 重消化し、生成した D N A 断片を 1 % 低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。精製した H 2 9 6 遺伝子を含む D N A 断片と E c o R I 及び B a m H I で消化した p C o l d 0 8 s 2 を混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含む L B 寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシー

クエンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これを pC o l d 0 8 s 2 - H 2 9 6 と命名した。また、同様にして5'-UTRへの挿入配列のない pC o l d 0 8 N C 2 に H 2 9 6 遺伝子を含む増幅DNA断片を組み込み pC o l d 0 8 - H 2 9 6 とした。

5 (2) - 3 プラスミドベクター pC o l d 0 8 s 2 - l a c の構築

β-ガラクトシダーゼ (l a c Z) 遺伝子を含むプラスミド pKM005 (1983年、ニューヨークアカデミックプレス発行、井上正順編集、エクスペリメンタル マニピュレーション オブ ジーン エクスプレッション、第15～32頁) を B a m H I、S a l I (タカラバイオ社製) で消化後、1% (w/v) 低融点アガロース電気泳動を行ない、l a c Z 遺伝子を含むDNA断片をゲルより精製してこれを5 μ l の滅菌水に懸濁した。この精製DNA断片と B a m H I 及び S a l I で消化した pC o l d 0 8 s 2 を混合し、DNAライゲーションキット (タカラバイオ社製) を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ l を用いて大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシーケンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これを pC o l d 0 8 s 2 - l a c と命名した。また、同様にして5'-UTRへの挿入配列のない pC o l d 0 8 N C 2 に l a c Z 遺伝子を含む増幅DNA断片を組み込み pC o l d 0 8 - l a c とした。

20 (3) 発現量の評価

(3) - 1 pC o l d 0 8 s 2 - G F P、pC o l d 0 8 s 2 - H 2 9 6 を用いた発現量評価

実施例1 - (2) - 1 及び (2) - 2 で作製した pC o l d 0 8 s 2 - G F P、pC o l d 0 8 s 2 - H 2 9 6 及び比較対照として pC o l d 0 8 - G F P、pC o l d 0 8 - H 2 9 6 を用いて、大腸菌 B L 2 1 (ノバジェン社製) 及び C L 8 3 [ジャーナル オブ バクテリオロジー (J. B a c t e r i o l.)、第180巻、第90～95頁 (1998)] を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ50 μ g / m l のアンピシリンを含む2.5 m l のLB培地に接種し、37℃で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ3 m l の同じ培地に1%

(v/v) ずつ植菌して37℃で振とう培養し、濁度がOD600nm=0.2に達した時点で、培養温度を15℃に下げて15分間保温した。その後、終濃度1mMになるようにIPTGを加え、そのまま培養温度を15℃に保ち24時間振とう培養した。濁度(OD600nm)を測定した後、2ml分の菌体を遠心分離により集め、100μlの菌体懸濁溶液(50mM トリス塩酸緩衝液、pH7.5、150mM 塩化ナトリウム)に懸濁した。前記の濁度から算出して約 3.75×10^6 個の菌数分に相当する懸濁液をそれぞれ10%SDSポリ

5 アクリルアミド電気泳動に供し、ゲルをCBB(クマジーブリリアントブルー)により染色した後、脱色を行なった(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は、生物化学実験のてびき2(化学同人社)に従った)。このゲルについてTotal Lab ver. 1.11(Nonlinear Dynamics社製)による画像解析を行い、GFP、H296それぞれの発現量を定量した。この結果より得られた、pCold08s2-GFP、pCold08s2-H296を保持する組み換え体による各蛋白質発現量を、それぞれ5'UTRへの挿入の

10 ないpCold08-GFP、pCold08-H296のものに対する倍率として表1に示した。

表1

| プラスミド | 宿主 | 発現倍率* |
|----------------|------|-------|
| pCold08s2-GFP | BL21 | 1.5倍 |
| | CL83 | 2.0倍 |
| pCold08s2-H296 | BL21 | 1.5倍 |
| | CL83 | 1.5倍 |

*発現倍率：画像解析の結果から算出されるpCold08s2クローン体の発現量/pCold08クローン体の発現量

表1に示したように、SDSポリアクリルアミドゲル解析の結果、5'UTRに20塩基の挿入を持つpCold08s2をベクターを用いて作製されたクローン体は、pCold08NC2のものを上回る発現量を有していた。

20

(3)-2 pCold08s2-lacを用いた発現量評価

実施例1-(2)-3で作製したpCold08s2-lac及び比較対照としてpCold08-lacを用いて、大腸菌BL21及びCL83を形質転換

した。得られた形質転換体をそれぞれ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 2.5 ml の LB 培地に接種し、 37°C で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ 3 ml の同じ培地に 1% (v/v) ずつ植菌して 37°C で振とう培養し、濁度が $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.2$ に達した時点で一部サンプリングした後、培養温度を 15°C に下げて 15 分間保温した。その後、終濃度 1 mM になるように IPTG を加えて発現を誘導し、そのまま培養温度を 15°C に保ちさらに培養した。これら誘導直前の 37°C 培養液及び誘導後 3 時間後、 24 時間後にサンプリングされた培養液を試料として 1972 年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、J. H. ミラー (J. H. Miller) 著、エクスペリメンツ イン モレキュラー ジェネティクス、第 $352 \sim 355$ 頁に記載の方法で β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行ない、その結果を表 2 に示した。

表 2 β -ガラクトシダーゼ活性 (ユニット)

| プラスミド | 宿主 | 誘導前 | 誘導 3 時間後 | 誘導 24 時間後 |
|---------------|------|-------|----------|-----------|
| pCold08-lac | BL21 | 10110 | 49510 | 85550 |
| | CL83 | 6971 | 28514 | 31504 |
| pCold08s2-lac | BL21 | 9151 | 66314 | 119770 |
| | CL83 | 5172 | 56028 | 72459 |

表 2 に示したように、誘導 24 時間後において、 $5'$ UTR に 20 塩基の挿入を持つ pCold08s2-lac を保持する形質転換体は、pCold08-lac を保持するものの 1.4 倍 (宿主: BL21)、 2.3 倍 (宿主: CL83) の β -ガラクトシダーゼ活性を有していた。

実施例 2 pCold08s12、pCold08s32 ベクターの構築及び蛋白質発現量の検討

(1) プラスミドベクター pCold08s12 ベクターの構築

プライマー Sp20F 及びプライマー CSPTerR にかえて、プライマー Sp12F、プライマー Sp12R (プライマー Sp12F 及び Sp12R の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 15 、 16 に示す) をそれぞれ使用した他は、上記の実施例 1-(1) の操作に従い、参考例 1 記載のプラスミド pCold08NC2 の $5'$ -UTR をコードする領域に 12 塩基の挿入変異が導入されたプ

ラスミド、pC o l d 0 8 s 1 2を構築した。

このpC o l d 0 8 s 1 2は、pC o l d 0 8 N c 2の5'-UTR（配列表の配列番号5）の+120～+121の間に5'-ATGTTTTGTAGA-3'（配列番号17）の塩基配列が挿入されている。pC o l d 0 8 s 1 2に含有されている5'-UTRの塩基配列を配列番号3に示す。

(2) プラスミドベクターpC o l d 0 8 s 3 2ベクターの構築

プライマーSp20F及びプライマーSP20Rにかえて、プライマーSp32F、プライマーSp32R（プライマーSp32F及びSp32Rの塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号18、19に示す）をそれぞれ使用した他は、上記の実施例1-（1）の操作に従い、参考例1記載のプラスミドpC o l d 0 8 N C 2の5'-UTRをコードする領域に32塩基の挿入変異が導入されたプラスミド、pC o l d 0 8 s 3 2を構築した。

このpC o l d 0 8 s 3 2は、pC o l d 0 8 N c 2の5'-UTR（配列表の配列番号5）の+120～+121の間に5'-ATGTTTTGTAGATTGAAAGAGTAGATTAGTA-3'（配列番号20）の塩基配列が挿入されている。pC o l d 0 8 s 3 2に含有されている5'-UTRの塩基配列を配列番号5に示す。

(3) プラスミドベクターpC o l d 0 8 s 1 2-H296、pC o l d 0 8 s 3 2-H296の構築

実施例1-（2）-1に記載の操作により、H296遺伝子を含む約1kbpのDNA断片を調製してEcoRIとBamHIで2重消化し、1%低融点アガロース電気泳動で分離後、抽出精製した。この精製DNA断片とEcoRI及びBamHIで消化したpC o l d 0 8 s 1 2またはpC o l d 0 8 s 3 2を混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。このライゲーション反応液を用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体をアンピシリンを含むLB寒天培地上で生育させた。得られたコロニーからプラスミドを調製し、DNAシーケンスを行ない、正しくPCR産物が挿入されたプラスミドを選択し、これらをそれぞれpC o l d 0 8 s 1 2-H296、pC o l d 0 8 s 3 2-H296と命名した。

(4) pC o l d 0 8 s 1 2 - H 2 9 6、pC o l d 0 8 s 3 2 - H 2 9 6を用いた発現量の評価

(3) で作製した pC o l d 0 8 s 1 2 - H 2 9 6、pC o l d 0 8 s 3 2 - H 2 9 6 及び比較対照として pC o l d 0 8 - H 2 9 6 を用いて、大腸菌 B L 2 1 及び C L 8 3 を形質転換した。得られた形質転換体をそれぞれ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 2.5 ml の LB 培地に接種し、 37°C で一晩振とう培養した。この培養液をそれぞれ 3 ml の同じ培地に 1% (v/v) ずつ植菌して 37°C で振とう培養し、濁度が $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.2$ に達した時点で、培養温度を 15°C に下げて 15 分間保温した。その後、終濃度 1 mM になるように IPTG を加え、そのまま培養温度を 15°C に保ち 24 時間振とう培養した。こうして得られた培養液について、実施例 1 - (3) - 1 に記載の操作により各組換え体における H 2 9 6 の発現量を定量した。この結果より得られた、pC o l d 0 8 s 1 2 - H 2 9 6、pC o l d 0 8 s 3 2 - H 2 9 6 を保持する組み換え体による各蛋白質発現量を、5'UTR への挿入のない pC o l d 0 8 - H 2 9 6 のものに対する倍率として表 3 に示した。

表 3

| プラスミド | 宿主 | 発現倍率* |
|------------------------------|---------|--------|
| pC o l d 0 8 s 1 2 - H 2 9 6 | B L 2 1 | 1. 3 倍 |
| | C L 8 3 | 1. 5 倍 |
| pC o l d 0 8 s 3 2 - H 2 9 6 | B L 2 1 | 1. 4 倍 |
| | C L 8 3 | 1. 8 倍 |

*発現倍率：画像解析の結果から算出される pC o l d 0 8 s 1 2 または pC o l d s 3 2 クローン体の発現量 / pC o l d 0 8 クローン体の発現量

SDS ポリアクリルアミドゲル解析の結果、5'-UTR 中に 1 2、3 2 塩基を挿入したベクターでは、挿入していないものに比べ発現量が上昇することが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、低温条件において高い発現効率を示す発現ベクターが提供される。該ベクターを用いることにより、目的の蛋白質を特異的に発現させ、高純度

の蛋白質標品を調製することができる。また該ベクターを利用して低温条件下で蛋白質発現を行うことにより、活性を保持した蛋白質を効率よく得ることが可能となる。

5 配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:2 : Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:3 : Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:4 : Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

SEQ ID NO:5 : Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

10 SEQ ID NO:6 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:7 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:8 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:9 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:10 : Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region
15 of cspA Gene

SEQ ID NO:11 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:12 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:13 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:14 : Synthetic Primer for PCR

20 SEQ ID NO:15 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:16 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:17 : Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region
of cspA Gene

SEQ ID NO:18 : Synthetic Primer for PCR

25 SEQ ID NO:19 : Synthetic Primer for PCR

SEQ ID NO:20 : Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region
of cspA Gene

請求の範囲

1. コールドショック蛋白質遺伝子mRNA由来の5' 非翻訳領域をコードする領域を有するベクターであって、前記5' 非翻訳領域が、該領域が形成するシステム構造の距離が変化するように変異を導入されたものであることを特徴とするベクター。

2. 導入された変異が、塩基の挿入若しくは欠失である請求項1記載のベクター。

3. 配列表の配列番号1中の塩基番号593～598に相当する領域に変異が導入されている請求項1または2記載のベクター。

4. 5' 非翻訳領域をコードする領域がさらにオペレーターを有している請求項1～3いずれか1項に記載のベクター。

5. 配列表の配列番号2、3、4のいずれかで示される塩基配列の5' 非翻訳領域をコードする領域を有している請求項4記載のベクター。

6. 5' 非翻訳領域をコードする領域の上流にプロモーターを有している請求項1～5いずれか1項に記載のベクター。

7. 5' 非翻訳領域をコードする領域の下流に、用いる宿主のリボソーマルRNAのアンチダウンストリームボックス配列と相補性を有する塩基配列を有している請求項1～6いずれか1項に記載のベクター。

8. プラスミドベクターである請求項1～7いずれか1項に記載のベクター。

9. 下記工程を包含することを特徴とする目的蛋白質の発現方法：

(1) 目的蛋白質をコードする遺伝子を組込んだ請求項1～8いずれか1項に記載のベクターで宿主を形質転換する工程、

(2) 得られた形質転換体を培養する工程、

(3) 培養温度を通常の温度より低下させて目的蛋白質を発現させる工程。

10. 工程(3)と同時にもしくはその後にプロモーターを誘導することを特徴とする請求項9記載の目的蛋白質の発現方法。

1/10

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> Cold-inducible expression vector

<130> 664200

<150> JP 2002-359956

<151> 2002-12-11

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1209

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

aagcttcgat gcaattcacg atcccgagcgt gtgatttgag gagttttcaa tggaatataa 60
agatccaatg catgagctgt tgagcagcct ggaacagatt gtttttaaag atgaaacgca 120
gaaaattacc ctgacgcaca gaacaacgctc ctgtaccgaa attgagcagt tacgaaaagg 180
gacaggatta aaaatcgatg atttcgcccc ggttttgggc gtatcagtcg ccatggtaaa 240
ggaatgggaa tccagacgcg tgaagccttc aagtgccgaa ctaaaattga tgcgtttgat 300
tcaagccaac ccggcattaa gtaagcagtt gatggaatag acttttatcc actttattgc 360
tgtttacggt cctgatgaca ggaccgtttt ccaaccgatt aatcataaat atgaaaaata 420
attgttgcac caccgcgcaa tgcgtggcctt aatgcacatc aacggtttga cgtacagacc 480

2/10

attaaagcag ttagtaagg caagtcctt caagagttat cgttgatacc cctcgtagt 540
cacattcctt taacgcttca aaatctgtaa agcacgccat atcgccgaaa ggcacactta 600
attattaaag gtaatacact atgtccgta aaatgactgg tatcgtaaaa tggttcaacg 660
ctgacaaagg cttcggttc atcactcctg acgatggctc taaagatgtg ttcgtacact 720
tctctgctat ccagaacgat ggttacaaat ctctggacga aggtcagaaa gtgtccttca 780
ccatcgaaag cggcgctaaa ggcccggcag ctggtaacgt aaccagcctg taatctctgc 840
ttaaagcac agaatctaag atccctgcc tttggcggg attttttat ttgtttcag 900
gaaataaata atcgatcgcg taataaaatc tattattatt tttgtgaaga ataaatttg 960
gtgcaatgag aatgcgcaac gccgtaagta aggcgggaat aatttccgc cgaagactct 1020
tactctttca atttgcaggc taaaacgcc gccagctcat aactctcctg tttaatatgc 1080
aattcacaca gtgaatctct tatcatccag gtgaaaaata aaagcgtgaa acaaatcact 1140
attaaagaaa gtaatctata tttctgcgca ttccagctct gtgttgattt cacgagtatg 1200
tactgcacc 1209

<210> 2

<211> 164

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 2

aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60
ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120
cgagcggata acaatttcac attaatatt aaagtaata cacc 164

3/10

<210> 3

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 3

```
aaattgtgag cggataacaa ttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60
ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120
catgttttgt agattaatta ttaaaggtaa tacacc                               156
```

<210> 4

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 4

```
aaattgtgag cggataacaa ttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60
ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120
catgttttgt agatttgaaa gagtagatta gtattaatta ttaaaggtaa tacacc       176
```

<210> 5

4/10

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 5

```
aaattgtgag cggataacaa tttgatgtgc tagcgcatat ccagtgtagt aaggcaagtc 60
ccttcaagag cctttaacgc ttcaaaatct gtaaagcacg ccatatcgcc gaaaggcaca 120
cttaattatt aaaggtaata cacc                                     144
```

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 6

```
gtgcgataa caatttcaca ttaattatta aaggtaatac                                     40
```

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5/10

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 7

tgcgattct cattgcaccc

20

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 8

tgtgaaattg ttatccgctc gtgtgccttt cggcgatatg

40

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 9

6/10

gttttccgc tagccaaatt gtgagcgat a

31

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA
Gene

<400> 10

gagcggataa caatttcaca

20

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 11

aagataacaa aggaattcga gtaaaggaga agaacttt

38

<210> 12

7/10

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 12

tctggacatt ctagattatt tgtatagttc atccatg

37

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 13

ccatccatgg aattcggcta ttctgcacc aactga

36

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

8/10

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 14

gaaaacctag gacccctatg tggaaggaac atccaa

36

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 15

catatcgccg aaaggcacac atgttttgta gattaattat taaaggtat ac

52

<210> 16

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 16

gtattacctt taataattaa tctacaaaac atgtgtgcct ttggcgata tg

52

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA Gene

<400> 17

atgttttgta ga

12

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 18

atgttttgta gatttgaaag agtagattag tattaattat taaaggtaat ac

52

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

10/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Primer for PCR

<400> 19

tactaatcta ctctttcaaa tctacaaaac atgtgtgcct ttcggcgata tg 52

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Nucleotide inserted into 5' Untranslated Region of cspA
Gene

<400> 20

atgttttgta gatttgaaag agtagattag ta 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X/Y | YAMANAKA, K. et al., Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of Escherichia coli., J.Bacteriol. (1999), Vol.181, No.20, pages 6284 to 6291 | 1-4, 6, 8-10/7 |
| Y/A | WO 99/27117 A1 (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 03 June, 1999 (03.06.99), Full text & AU 9910546 A & EP 1033408 A1 & KR 2001032249 A & JP 2000-522258 A & US 6479260 B1 & US 2003/0082799 A1 | 7/1-6, 8-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
|---|--|

Date of the actual completion of the international search
13 February, 2004 (13.02.04)

Date of mailing of the international search report
24 February, 2004 (24.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15835

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO 96/03521 A1 (LASTER MC.), 08 February, 1996 (08.02.96), Full text & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A | 1-10 |
| A | VASINA, JA. et al., Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major Escherichia coli cold shock promoter cspA., Appl.Environ.Microbiol. (1996), Vol.62, No.4, pages 1444 to 1447 | 1-10 |
| A | XIA, B. et al., The Cold Box stem-loop proximal to the 5'-end of the Escherichia coli cspA gene stabilizes its mRNA at low temperature., J.Biol. Chem., (22 February, 2002 (22.02.02)), Vol.277, No.8, pages 6005 to 6011 | 1-10 |
| A | FANG, L. et al., Transcription of cspA, the gene for the major cold-shock protein of Escherichia coli, is negatively regulated at 37 degrees C by the 5'-untranslated region of its mRNA., FEMS Microbiol.Lett.(1999), Vol.176, No.1, pages 39 to 43 | 1-10 |
| A | WANG, N. et al., CspI, the ninth member of the CspA family of Escherichia coli, is induced upon cold shock., J.Bacteriol.(1999), Vol.181, No.5, pages 1603 to 1609 | 1-10 |
| A | GLODENBERG, D. et al., Role of Escherichia coli cspA promoter sequences and adaptation of translational apparatus in the cold shock response., Mol.Gen.Genet.(1997), Vol.256, No.3, pages 282 to 290 | 1-10 |
| A | WOUTERS, JA. et al., Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five csp genes of Lactococcus lactis MG1363., Microbiology.(1998), Vol.144, No.10, pages 2885 to 2893 | 1-10 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N 15/09, C12P 21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' C12N 15/09, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X/Y | YAMANAKA, K. et al., Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of Escherichia coli. J Bacteriol. (1999) Vol. 181, No. 20, p. 6284-6291 | 1-4, 6, 8-10/7 |
| Y/A | WO 99/27117 A1 (資酒造株式会社) 1999.06.03, 全文 & AU 9910546 A & EP 1033408 A1 & KR 2001032249 A & JP 2000-522258 A & US 6479260 B1 & US 2003/0082799 A1 | 7/1-6, 8-10 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.02.2004

国際調査報告の発送日

24.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | WO 96/03521 A1 (LASTER MC) 1996.02.08, 全文 & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A | 1-10 |
| A | VASINA, JA. et al., Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major Escherichia coli cold shock promoter cspA. Appl Environ Microbiol. (1996) Vol. 62, No. 4, p. 1444-1447 | 1-10 |
| A | XIA, B. et al., The Cold Box stem-loop proximal to the 5'-end of the Escherichia coli cspA gene stabilizes its mRNA at low temperature. J Biol Chem. (2002.02.22) Vol. 277, No. 8, p. 6005-6011 | 1-10 |
| A | FANG, L. et al., Transcription of cspA, the gene for the major cold-shock protein of Escherichia coli, is negatively regulated at 37 degrees C by the 5'-untranslated region of its mRNA. FEMS Microbiol Lett. (1999) Vol. 176, No. 1, p. 39-43 | 1-10 |
| A | WANG, N. et al., CspI, the ninth member of the CspA family of Escherichia coli, is induced upon cold shock. J Bacteriol. (1999) Vol. 181, No. 5, p. 1603-1609 | 1-10 |
| A | GOLDENBERG, D. et al., Role of Escherichia coli cspA promoter sequences and adaptation of translational apparatus in the cold shock response. Mol Gen Genet. (1997) Vol. 256, No. 3, p. 282-290 | 1-10 |
| A | WOUTERS, JA. et al., Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five csp genes of Lactococcus lactis MG1363. Microbiology. (1998) Vol. 144, No. 10, p. 2885-2893 | 1-10 |